大豆球蛋白的抗营养作用及检测技术研究进展

宋青龙[1]　袁　翔[1]　张海燕[1]　谯仕彦[2*]

（1.北京龙科方舟生物工程技术有限公司，北京 100193；2.国家饲料工程技术研究中心，北京 100193）

摘　要：大豆球蛋白是热稳定性最强的抗原蛋白之一，同时也是大豆引起动物过敏反应和腹泻的主要成分。本文重点阐述了大豆球蛋白对仔猪、犊牛和鱼等动物的抗营养作用及其作用机理，并对检测大豆及其副产品中大豆球蛋白的方法进行了分析，着重介绍了酶联免疫吸附测定法（ELISA）的最新研究进展，希望为大豆及其副产品的开发提供一定参考。

关键词：大豆球蛋白；抗营养作用；检测方法；应用

中图分类号：S816　　文献标识码：　　文章编号：

饲粮过敏反应的现象在畜禽生产中时有发生。大量研究发现，在幼龄动物饲粮中添加生大豆作为蛋白质来源会导致仔猪、犊牛等幼龄动物的肠黏膜增生肿大、过敏性腹泻、生长受阻等不良反应，严重的会导致死亡[1-4]。已有研究证实，大豆球蛋白（glycinin）是大豆抗原蛋白中免疫原性最强的因子之一，约占大豆籽实蛋白总量的 40%。大豆球蛋白是由 6 个单聚体亚基（A—S—S—B）组成的多聚体，相对分子质量为 320~360 ku。每个亚基是由酸性多肽（A）和碱性多肽（B）组成，二者由二硫键（S—S）链接起来[5]。大豆球蛋白热稳定性好，一般加热处理对其灭活能力较弱。因此，了解掌握大豆球蛋白的抗营养作用及其机理、检测方法等对指导动物生产具有一定的意义。

1　大豆球蛋白的抗营养作用及其机理

已有的研究发现，大豆球蛋白主要引起仔猪、犊牛等幼龄动物和婴儿的过敏反应[5-6]。刘欣[6]在小鼠试验中发现，中低剂量的大豆球蛋白容易引发 BALB/c 小鼠的速发型过敏反应，该过敏反应是由 Th1 和 Th2 型 T 淋巴细胞同时介导但以 Th2 型为主的免疫反应。研究中还发现，肠黏膜的 T 调节细胞亚群以及所分泌的抑制性细胞因子功能不足是导致小鼠过敏的最主要的原因。孙鹏[7]在仔猪研究中发现，大豆球蛋白诱发仔猪的过敏反应为 Th2 型免疫反应，此反应是免疫球蛋白 E（IgE）介导的速发型过敏反应，过敏仔猪皮肤试敏反应呈阳性，血清及肠道匀浆液中 IgE 抗体浓度升高，血清中大豆球蛋白特异性抗体免疫球蛋白 G1（IgG1）以及 Th2 型细胞因子白细胞介素-4 和白细胞介素-10 水平升高，小肠肥大细胞数量和组胺释放增加，导致过敏仔猪生长性能下降并发生过敏性腹泻。Wang[8]在研究大豆球蛋白在消化系统代谢规律中发现，大豆球蛋白的免疫活性由胃到小肠逐渐下降，到回肠时，剩余大豆球蛋白的活性为 5.5%，特异性结合的抗原蛋白主要分布在胃黏膜、小肠绒毛、隐窝和肠系膜淋巴结中。上述试验进一步验证了断奶仔猪饲喂含有大豆球蛋白的饲粮后可以引起绒毛高度的急剧下降，绒毛的严重脱落，肠黏膜淋巴细胞增生和隐窝细胞有丝分裂加快[2, 9]。最近研究发现，采用营养学技术可以缓解大豆球蛋白致敏活性，维生素 C[10]、硫辛酸[11]、葡萄籽

花青素[12]等抗氧化物质可通过调节断奶动物体内辅助性 T 淋巴细胞 Th1 和 Th2 的平衡，减少大豆球蛋白特异性 IgE 的产生和组胺释放，从而有效缓解由大豆球蛋白引起的断奶应激所导致的腹泻。

最近几年，大豆球蛋白对犊牛生产性能及作用机理的研究报道并不多。早期研究认为，饲喂大豆球蛋白的犊牛小肠绒毛萎缩，隐窝细胞增生，小肠对木糖的吸收下降，进而降低了犊牛的生产性能[13-15]。犊牛胃的收缩力减弱，肠道收缩能力增强，其结果是食糜通过时间显著缩短，养分消化率降低[16-17]。其作用机制可能是，犊牛采食含有大豆球蛋白的饲粮后，大量完整的大豆球蛋白分子被直接吸收进入血液和淋巴循环，产生特异性抗体介导的 I 型过敏反应和淋巴细胞介导的迟发型过敏反应，进而破坏消化系统，影响营养物质消化吸收，降低生产性能[18]。

大豆球蛋白对鱼等水产动物的研究主要集中在最近 10 年。目前研究认为，大豆球蛋白对鱼生长性能的影响主要包括 2 个方面：一方面，大豆球蛋白可引起鱼类肠道过敏反应，导致肠道组织损伤及结构变化，影响肠道对营养物质的消化和吸收，进而降低鱼类的生长性能。Rumsey 等[19]报道，饲料中大豆球蛋白含量为 58.8 mg/g 时，会引起虹鳟肠道结构的变化，导致其生长性能下降。Baeverfjord 等[20]报道，大西洋鲑饲喂豆粕后，后肠单褶皱襞和复合褶皱襞高度分别降低了 44.3%和 21.7%。Refstie 等[21]、Ksudhik 等[22]分别在虹鳟和欧洲真鲈的饲料中添加一定水平的大豆球蛋白，结果表明，鱼后肠绒毛上皮的黏膜褶缩短，黏膜固有层加深加宽，同时肠黏膜发生了炎症反应。吴莉芳等[23]在研究大豆球蛋白对不同食性鱼类生长及肠道组织的影响时发现，添加大豆球蛋白组的鲤和埃及胡子鲇中肠、后肠及草鱼前肠、中肠、后肠的皱襞高度均极显著低于对照组；鲤鱼前肠、后肠和埃及胡子鲇后肠及草鱼前肠绒毛均有不同程度破损，固有层组织较疏松而且断裂。另一方面，饲料中添加大豆球蛋白可以使肠道消化酶活性的降低，影响鱼的生长性能。吴莉芳等[24]在研究中报道，大豆球蛋白添加到 30 g/kg 时，鲤稚鱼后肠和中肠的蛋白酶活性显著下降，添加到 60 g/kg 时，鲤幼鱼蛋白酶活力显著下降，对淀粉酶活性的影响不显著。孙玲[25]报道，饲喂含有大豆球蛋白饲料的肉食性鱼类埃及胡子鲶胃、前肠、肝胰脏蛋白酶活性显著降低，前肠和后肠淀粉酶活性显著降低。Krogdahi 等[26]研究表明，饲喂含豆粕饲料的虹鳟中肠和后肠上皮刷状缘胞外酶、麦芽糖酶、碱性磷酸酶、乳糖酶和蔗糖酶活性均出现不同程度的降低。总之，大豆球蛋白对鱼生产性能产生了不良影响，但是其作用机制如何，对其他水产动物生产性能是否有不良影响？这还需要进一步做大量的研究工作。

2 大豆球蛋白的酶联免疫吸附测定法（ELISA）检测及应用

目前常用的大豆球蛋白检测方法包括聚丙烯凝胶电泳法（SDS-PAGE）、高效液相色谱法、ELISA、免疫印迹法和免疫组织化学法。其中高效液相色谱法（色谱-质谱联用法）、免疫印迹法和免疫组织化学法 3 种方法操作繁琐，检测成本高，在实际生产使用较少。SDS-PAGE 属于定性及半定量检测，是根据大豆抗原蛋白的特征条带染色后颜色的深浅来估

算其含量。黄丽华等[27]利用 SDS-PAGE 分析我国 828 批次大豆品种种子中 11S（主要成分为大豆球蛋白）和 7S（主要组分为 β-伴大豆球蛋白）组分相对含量及其亚基组成和各亚基含量，结果发现 11S 在 2 种球蛋白中的含量为 37.57%~81.42%，平均值为 60.30%，11S/7S 值为 0.60~4.38，平均值为 1.56。关荣霞[28]用 SDS-PAGE 分析了 175 份中国栽培大豆中 11S 和 7S 相对含量相及 11S/7S 值时发现，11S/7S 值为 0.77~4.67，平均值为 1.8；同时发现，北方春大豆中该比值分布与整体趋势一致，黄淮夏大豆比值分布集中在 1.6~1.8，南方春大豆比值多低于 1.4，而南方夏大豆比值多分布于 2.0~2.2，说明不同栽培地区的大豆中大豆球蛋白的含量差异较大。麻浩等[29]采用 SDS-PAGE 分析了 706 份中国大豆种质资源中 7S、11S 组分及其亚基相对含量，结果表明，11S 和 7S 组分及其亚基相对含量具有丰富的遗传变异。SDS-PAGE 具有操作简单、检测成本低等优势，其最主要缺点是不能区分抗原蛋白是否具有活性，导致定量不够精确，既不利于生产企业对大豆及其副产品质量进行的精准监控，又不利于饲料和养殖企业对其开展合理评价和选择。

ELISA 是一种高通量的检测方法，其特点是敏感度高、特异性强、快速简单、易操作。彭楠等[30]采用酸沉淀和亲和层析分离纯化到纯度为 95%的大豆球蛋白，并用该纯品免疫大白兔获得多克隆抗体，建立起间接竞争 ELISA 方法，线性检测范围在 10~100 μg/mL。韩景华[31]获得纯度为 90.1%的大豆球蛋白，并用其免疫兔子制备多克隆抗体，建立检测大豆球蛋白的双抗夹心 ELISA 方法，线性检测范围在 2.5~5,000 ng/mL，灵敏度达到了 2.5 ng/mL。Ma 等[32]用纯度大于 92%的大豆球蛋白免疫小鼠制备了单克隆抗体 4B2，建立了大豆球蛋白的竞争性 ELISA 方法，其线性检测范围在 0.3~11.2 μg/mL，检测限达到了 0.3 ng/mL。布冠好等[33]用纯品大豆球蛋白免疫兔子制备多克隆抗体，建立大豆球蛋白的间接竞争 ELISA 检测方法，线性检测范围在 0.01~0.05 μg /mL。陈静舒[34]用人工分离纯化纯度大于 85%的大豆球蛋白制备兔多克隆抗体和鼠单克隆抗体，建立双抗夹心 ELISA 检测大豆球蛋白，该方法的线性范围为 3~200 ng/mL，灵敏度达到 1.63 ng/mL。张诗尧[35]采用自制的大豆球蛋白免疫兔子制备的多克隆抗体为一抗，辣根过氧化酶标记抗兔免疫球蛋白 G（IgG)为酶标二抗，建立了直接 ELISA 方法检测大豆及其制品中大豆球蛋白含量，灵敏度达到 10 ng/mL。随着蛋白纯化和克隆抗体技术的进步，使用检测成本低，精准快捷的 ELISA 方法，检测大豆及其制品中大豆球蛋白和其他抗原蛋白含量将是实际生产中一种较好的选择。

目前，我国饲料行业常用的大豆加工产品包括有膨化大豆、豆粕、带皮豆粕、去皮豆粕、去皮膨化豆粕、发酵豆粕、大豆分离蛋白以及大豆浓缩蛋白等。作者总结了近几年采用 ELISA 方法检测大豆及其副产品中大豆球蛋白含量的试验研究，从表 1 可以看出，大豆经过加工提油后生成豆粕，无论是从均值还是区间值看，大豆球蛋白含量没有发生较大的变化。而发酵豆粕、膨化大豆、大豆浓缩蛋白、大豆分离蛋白等大豆和豆粕的深加工产品中大豆球蛋白含量均有较大幅度的降低，说明大豆通过一般性的加工手段（压榨等）不能有效降低大豆球蛋白的含量，而通过生物发酵、高温等深加工处理可以降低其的含量，但是也不能彻底去除。

此外，高温对大豆及其产品中的主要营养物质影响较大。因此，开发既保证大豆中的主要营养物质含量，又降低大豆球蛋白等抗营养因子含量的加工工艺，是动物营养学者面临的一个重要课题。

大豆蛋白质约占大豆籽粒的 40%，大豆球蛋白是纯化的 11S 大豆球蛋白，是大豆蛋白质中最大的单体成分，占大豆籽实蛋白质总量的 25%~35%[18]。据此推算 1 g 大豆中理论上约含有 100~140 mg 大豆球蛋白。从表 1 中可以看出，899 份生大豆中大豆球蛋白含量与理论值非常接近，说明 ELISA 是一种比较准确的检测方法，能真实地反映大豆及其制品中大豆球蛋白的含量。

表 1　大豆及其加工产品中大豆球蛋白含量

Table 1　Glycinin content in soybean and soybean products

种类 Types	大豆球蛋白含量 Glycinin content(mg/g)	样本数 Sample number	样本来源 Sample source	参考文献 References
生大豆 Raw soybea	125.5（均值）	410	中国、美国、巴西、阿根廷等	周天娇等[36]
	124.1(均值)	469	中国、美国等	陈静舒[34]
	91.0~143.1	20	黑龙江、安徽、陕西、美国和巴西	姚怡莎等[37]
膨化大豆 Extruded soybean	20.9（均值）	12	北京、黑龙江、河南和广西	周天娇等[36]
	17.7~64.5	19	黑龙江、河南、上海和广西等	姚怡莎等[37]
豆粕 Soybean meal	58.9~177.3	65	山东、河南、天津、北京、辽宁和黑龙江等 10 个省	杨玉娟等[38]
去皮豆粕 Dehulled soybean meal	119.5（均值）	25	黑龙江、辽宁、北京、天津等	周天娇等[36]
带皮豆粕 Regular soybean meal	129.0（均值）	3	黑龙江和天津	周天娇等[36]
去皮膨化豆粕 Extruded soybean meal	140.0（均值）	21	北京、天津、黑龙江、山东、河南	周天娇等[36]
发酵豆粕 Fermented soybean meal	≤109.34	54	山东、河南、广东、天津、江西和辽宁等 13 个省	杨玉娟等[38]
	52.4（均值）	188	北京、天津、山东、河南、内蒙、辽宁、湖北和四川等	周天娇等[36]
大豆分离蛋白 Soybean protein	12.0（均值）	2	北京	周天娇等[36]

isolate				
大豆浓缩蛋白 Soybean protein concentrate	2.4（均值）	6	广西和山东	周天娇等[36]

3 小 结

大豆球蛋白作为大豆中的主要耐热型抗营养因子，对使用大豆及其副产品作为饲料原料的动物（特别是幼龄动物）都会产生不良的影响。目前对于仔猪和犊牛生产性能影响的研究较多，需要进一步研究如何更准确使用不同含量的大豆球蛋白的饲料原料，做到精准饲喂，降低影响。对于水产动物的研究也相对较多，需要研究大豆球蛋白对不同种类的水产动物生产性能的影响和作用机理，做到精准使用。

ELISA 具有操作简便、快速准确、价格低等优势，是一种测定大豆及其副产品中大豆球蛋白含量的可行方法，但由于大豆副产品较多，成分复杂，需要研究不同的前处理方法，避免杂质干扰。此外，大豆球蛋白由 6 个亚基构成，有些品种大豆球蛋白某些亚基会缺失，需制备更多的单克隆抗体，提高检测的准确性。

大豆球蛋白作为豆科植物在抵御外部不良环境时产生的一类物质，既具有营养价值，又具有明显的抗营养作用。因此，如何保持大豆及其副产品中蛋白质营养又适当降低其中的抗原蛋白含量需要进一步探讨。大豆抗营养因子对畜禽和水产动物特别是幼龄动物生长性能均有较大影响，能否将大豆球蛋白和其他抗营养因子作为大豆及其副产品质量好坏的评价指标亦需要营养学者的进一步研究和推动。

参考文献：

[1] LI D F,NELSSEN J L,REDDY P G,et al.Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig[J].Journal of Animal Science,1990,68(6):1790–1799.

[2] LI D F,NELSSEN J L,REDDY P G,et al.Measuring suitability of soybean products for early-weaned pigs with immunological criteria[J].Journal of Animal Science,1991,69(8):3299–3307.

[3] LALLÈS J P,TUKUR H M,SALGADO P,et al.Immunochemical studies on gastric and intestinal digestion of soybean glycinin and β-conglycinin *in vivo*[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,1999,47(7):2797–2806.

[4] QIN G,TER ElST E R,BOSCH M W,et al.Thermal processing of whole soya beans:studies on the inactivation of antinutritional factors and effects on ileal digestibility in piglets[J].Animal Feed Science and Technology,1996,57(4):313–324.

[5] HOU D H,CHANG S K C.Structural characteristics of purified glycinin from soybeans stored under various conditions[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2004,52(12):3792–3800.

[6] 刘欣.大豆球蛋白 glycinin 和 β-conglycinin 引发 Balb/c 小鼠过敏反应及其机理的研究[D].博士毕业论文.杭州:浙江大学,2008:52–74.

[7] 孙鹏.大豆抗原蛋白 Glycinin 诱发仔猪过敏反应的机理及其缓解机制的研究[D].博士毕业论文.北京:中国农业大学,2009:17–35.

[8] WANG T,QIN G X,SUN Z W,et al.Comparative study on the residual rate of immunoreactive soybean glycinin (11S) in the digestive tract of pigs of different ages[J].Food and Agricultural Immunology,2010,21(3):201–208.

[9] STOKES C R,MILLER B G,BAILEY M,et al.The immune response to dietary antigens and its influence on disease suscepetibility in farmanimals[J].Veterinary Immunology and Immunopathology,1987,17(1/2/3/4):413–423.

[10] SUN P,LI D F,DONG B,et al.Vitamin C:an immunomodulator that attenuates anaphylactic reactions to soybean glycinin hypersensitivity in a swine model[J].Food Chemistry,2009,113(4):914–918.

[11] HAN P F,MA X,YIN J D.The effects of lipoic acid on soybean beta-conglycinin-induced anaphylactic reactions in a rat model[J].Archives of Animal Nutrition,2010,64(3):254–264.

[12] SONG P X,ZHANG R J,WANG X X,et al.Dietary grape-seed procyanidins decreased post-weaning diarrhea by modulating intestinal permeability and suppressing oxidative stress in rats[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2011,59(11):6227–6232.

[13] BARRATT M E J,STRCHAN P J,PORTER P.Antibody mechanisms implicated in digestive disturbances following ingestion of soya protein in calves and piglets[J].Clinical & Experimental Immunology,1978,31(2):305–312.

[14] SEEGRABER F J,MORRILL J L.Effect of protein source in calf milk replacers on morphology an absorptive ability of the small intestine[J].Journal of Dairy Science,1986,69(2):460–469.

[15] 孙泽威,秦贵信,张庆华.大豆抗原蛋白对犊牛生长性能、日粮养分消化率和肠道吸收能力的影响[J].中国畜牧杂志,2005,41(11):30–33.

[16] SISSONS J W,PEDERSEN H E,DUVAUX C.Abnormalities in gastrointestinal motility in calves fed antigenic soybean protein[M]//CHANDRA K R.Food Allergy.St. Johns,Newfoundland:Nutrition Research Education Foundation,1987:95–108.

[17] 孙泽威.大豆中主要抗原物质对犊牛的影响[D].硕士学位论文.长春:吉林农业大学,2003:6–10.

[18] 李德发.大豆抗营养因子[M].北京:中国科学技术出版社,2003:151–152,139–140.

[19] RUMSEY G L,SIWICKI S K,ANDERSON D P,et al.Effect of soybean protein on serological response,non-specific defense mechanisms,growth,and protein utilization in rainbow trout[J].Veterinary Immunology and Immunopathology,1994,41(3/4):323–329.

[20] BAEVERFJORD G,KROGDAHI A.Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon,*Salmo salar* L.,distal intestine:a comparison with the intestines of fasted fish[J].Journal of Fish Diseases,1996,19(5):375–387.

[21] REFSTIE S,STOREBAKKEN T,BAEVERFJORD G,et al.Long-term protein and lipid growth of Atlantic salmon (*Satmo salar*) feddiets with partial replacement of fish meal by soy protein products at medium or high lipid level[J].Aquaculture,2001,193(1/2):91–106.

[22] KSUDHIK S J,COVÈS D,DUTTO G,et al.Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost,the European seabass,*Dicentearchus Labrax*[J].Aquaculture,2004,230(1/2/3/4):391–404.

[23] 吴莉芳,孙泽威,秦贵信,等.Glycinin 和 β-Conglycinin 对不同食性鱼类生长及肠道组织的影响[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2011,39(2):59–66,74.

[24] 吴莉芳,赖红娥,杨婳,等.大豆抗原蛋白 Glycinin 对鲤稚鱼、幼鱼蛋白酶和淀粉酶活力的影响[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2013,41(12):30–36.

[25] 孙玲.大豆抗原蛋白对不同食性鱼类消化酶活性及血液指标的影响[D].硕士学位论文.长春:吉林农业大学,2008:24–26.

[26] KROGDAHI Å,BAKKE-MCKELLEP A M,BAEVERFJORD G.Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure mucosal enzyme activities,and pancreatic response in Atlanticsalmon (*Salmo salar* L.)[J].Aquaculture Nutrition,2003,9(6):361–371.

[27] 黄丽华,麻浩,王显生,等.大豆种子贮藏蛋白 11S 和 7S 组分的研究[J].中国油料作物学报,2003,25(3):20–23.

[28] 关荣霞,常汝镇,邱丽娟,等.栽培大豆蛋白亚基 11S/7S 组成及过敏蛋白缺失分析[J].作物学报,2004,30(11):1076–1079.

[29] 麻浩,王显生,刘春,等.706 份中国大豆种质贮藏蛋白 7S 和 11S 组分及其亚基相对含量的研究[J].大都科学,2006,25(1):11–17.

[30] 彭楠,刘建峰,梁运祥,等.间接竞争 ELISA 检测大豆 11S 球蛋白和 7S 伴球蛋白[J].华中农业大学学报,2007,26(5):661–664.

[31] 韩景华.双抗体夹心 ELISA 检测大豆 11S 球蛋白方法的建立[D].硕士学位论文.合肥:安徽农业大学,2009:39–40.

[32] MA X,SUN PHE P L,et al.Development of monoclonal antibodies and a competitive ELISA detection method for glycinin,an allergen in soybean[J].Food Chemistry,2010,121(2):546–551.

[33]
布冠好,朱婷伟,陈复生,等.大豆球蛋白间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J].河南工业大学学报:自然科学版,2014,35(4):1–5,11.
[34]
陈静舒.大豆球蛋白单抗制备和 ELISA 检测试剂盒研究及其应用[D].硕士论文.北京:中国农业大学,2014:26–30.
[35] 张诗尧,赵元,鲍男,等.大豆球蛋白直接 ELISA 检测方法的建立 与初步应用[J].大豆科学,2016,35(4):660–665.
[36]
周天娇,谯仕彦,马曦,等.大豆饲料产品中主要抗营养因子含量的检测与分析[J].动物营养学报,2015,27(1):221–229.
[37]
姚怡莎,谷旭,商方方,等.大豆和膨化大豆主要抗营养因子分析[J].中国农业科学,2016,49(11):2174–2182.
[38]
杨玉娟,姚怡莎,秦玉昌,等.豆粕与发酵豆粕中主要抗营养因子调查分析[J].中国农业科学,2016,49(3):573–580.

Progress in Anti-Nutritional Action of Glycinin and Its Detection Technology

SONG Qinglong[1] YUAN Xiang[1] ZHANG Haiyan[1] QIAO Shiyan[2*]
(1. *Beijing Longkefangzhou Bio-Engineering Technology Co., Ltd.*, *Beijing* 100193, *China*; 2. *National Feed Engineering Technology Research Center*, *Beijing* 100193, *China*)

Abstract: Glycinin is one of the most thermal stability soybean antigenic protein, as well as an allergen, which is the main component causing the allergy and diarrhea of animals. The paper mainly expounded the anti-nutritional action and resistance mechanism of glycinin for piglets, calves and fishes, analyzed the detection methods of glycincin in soybean and its by-products, and emphatically introduced the latest research progress of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) detection method, aiming to provide references for the use of soybean and its by-products.

Key words: glycinin; antinutritional action; detection method; application

---